Aus der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. J. H e i d r i c h

und

aus der Lehr- und Versuchsstation der Arbeitsgemeinschaft
Schleswig-Holsteinischer Rinderbesamungsvereinigungen e.V.
Schönböken
Tierärztliche Leitung: Dr. N. M ä c k l e

Vergleichende mikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Glycerin auf Bullensperma in mit Eidotter angereichertem und eidotterfreiem Magermilchverdünner unter besonderer Berücksichtigung der Lagerung bei einer Temperatur von + 5°C, der Einwirkung eines Kälteschocks und hypertonischer Kochsalzlösungen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Severin
Tierarzt aus Badeborn

Berlin 1965
Journal-Nr. 486

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0025

Aus der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. J. H e i d r i c h

und

aus der Lehr- und Versuchsstation der Arbeitsgemeinschaft
Schleswig-Holsteinischer Rinderbesamungsvereinigungen e.V.
Schönböken
Tierärztliche Leitung: Dr. N. M ä c k l e

Vergleichende mikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Glycerin auf Bullensperma in mit Eidotter angereichertem und eidotterfreiem Magermilchverdünner unter besonderer Berücksichtigung der Lagerung bei einer Temperatur von + 5°C, der Einwirkung eines Kälteschocks und hypertonischer Kochsalzlösungen

ACAD.
LUGD. B.
BIBL.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Severin
Tierarzt aus Badeborn

Berlin 1965
Journal-Nr. 486

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch

Referent: Prof. Dr. H. J. Heidrich

Korreferent: Prof. Dr. E. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1965

M E I N E N E L T E R N G E W I D M E T

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literaturübersicht	2
I. Überblick über die Entwicklung der Spermaverdünner	2
a Körpereigene Flüssigkeiten	2
b Salinische Lösungen	2
c Pufferlösungen unter Zusatz von Zuckern	2
d Eidotterverdünner	3
e Milchverdünner	3
II. Glycerin als Zusatz zum Spermaverdünner	4
a Historischer Überblick	4
b Wirkung des Glycerins auf die Spermien	5
c Beeinflussung des Besamungsergebnisses	7
C. Eigene Untersuchungen	10
I. Allgemeines zur Versuchsanordnung	10
a Untersuchungsmaterial	10
b Verdünner und Verdünnungstechnik	10
c Die mikroskopische Untersuchung und Beurteilung des konservierten Samens	12

Seite

II. Untersuchung des Spermas nach Lagerung über 7 Tage bei Kühlschranktemperatur von + 5°C 15

a Versuchsergebnisse und ihre Besprechung 15

b Auswertung 23

III. Untersuchung des Spermas nach Einwirkung eines Kälteschocks 25

a Allgemeines zur Versuchsanordnung 25

b Vorversuche 26

c Hauptversuche und Besprechung der Ergebnisse 29

d Auswertung 31

IV. Untersuchung des Spermas nach Zusatz hypertonischer Kochsalzlösungen 32

a Allgemeines zur Versuchsanordnung 32

b Vorversuche und ihre Ergebnisse 33

c Hauptversuche und Besprechung der Ergebnisse 34

d Auswertung 37

D. Diskussion 38

E. Zusammenfassung 41

F. Literaturverzeichnis 43

A. EINLEITUNG

Die künstliche Besamung ist im Verlaufe der letzten 20 Jahre zu einem sehr wesentlichen Faktor in der Rinderzucht geworden. Sie bot den entscheidenden Vorteil, den Samen einiger weniger Vatertiere bester Leistungsanlagen auf eine große Zahl weiblicher Tiere verteilen und dadurch auf breiter Basis rasch zu hervorragender Nachzucht kommen zu könren. Wenn auch das Bullenejakulat wegen seiner natürlichen hohen Spermiendichte schon von vornherein die besten Voraussetzungen für die zur rationellen Verteilung notwendige Verdünnung bot, so waren doch langwierige Untersuchungen nötig, um Verdünnungsmedien zu finden, die, neben der Vermehrung des Ejakulatvolumens, optimale Konservierungseigenschaften zur Erhaltung der Lebens- und Befruchtungsfähigkeit für eine möglichst lange Zeit besaßen.

In den letzten Jahren ist verschiedentlich über die günstige Wirkung eines Glycerinzusatzes zu den gebräuchlichen Spermaverdünnern im Hinblick auf die Befruchtungsrate berichtet worden. Über den Einfluß des Glycerins auf verdünnte, bei Kühlschranktemperatur aufbewahrte Ejakulate und über seine möglichen Schutzeigenschaften für Ejakulate gegenüber exogenen Belastungen ist dagegen kaum etwas bekannt. Es wurde mir daher von Herrn Professor Dr. H e i d r i c h, angeregt durch einschlägige Diskussionen mit Herrn Dr. M ä c k l e, die Aufgabe gestellt, diesen Fragen nachzugehen.

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Überblick über die Entwicklung der Spermaverdünner

a) Körpereigene Flüssigkeiten

Systematische Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Körpersekrete auf Frosch- und Säugetiersperma führte als erster KÖLLIKER (1856) durch. Lymph- und Blutserum, Milch, flüssiges Eiweiß, sowie die Flüssigkeit aus dem Glaskörper des Ochsenauges waren in der Lage, Säugetiersperma über einige Zeit lebensfähig zu erhalten. Harn, Speichel, Galle, saure Milch und saurer Schleim dagegen machten die Spermien unbeweglich.

b) Salinische Lösungen

In zahlreichen Versuchen überprüfte HATZIOLOS (1937) die Wirkung physiologischer Salzlösungen auf Spermien, die anfangs zur Vergrößerung des Ejakulatvolumens verwendet wurden. Ringer-, Thyrode- und Lockelösung waren der physiologischen Kochsalzlösung unterlegen. Die Lebensfähigkeit der Spermien wurde in physiologischer Kochsalzlösung gegenüber unverdünnten Ejakulaten nicht verkürzt.

c) Pufferlösungen unter Zusatz von Zuckern

Der günstige Einfluß von Dextrose und Glukose auf Säugetiersperma wurde von MILOWANOW und SELIWANOWA (1932) durch die Entwicklung von Glukose-Phosphat-, Glukose-Sulfat- und Glukose-Tartrat-Lösungen nutzbar gemacht. Dextrose und Glukose als Zugabe zum Spermaverdünner gleichen den durch den hohen Stoffwechsel der Samenzellen schnell erschöpften Fruktosegehalt der Ejakulate aus. Die Pufferwirkung der Sulfat-, Tartrat- und der auch heute noch gebräuchlichen Phosphat- und Zitrat-Lösungen schützt die Spermien vor schädigenden Stoffwechselprodukten. Unter aeroben Bedingungen schränken die Phosphatpuffer den Sauerstoffverbrauch der Spermien ein und hemmen die Oxydation der Milchsäure (BISHOP u. SALISBURY, 1955).

d) Eidotterverdünner

Durch Zusatz von frischem Eidotter zu einem Phosphatpuffer gelang es LARDY und PHILLIPS (1939) die Lebensdauer des unverdünnten Spermas erheblich zu verlängern. Die Kolloide des Eidotters machen das Sperma gegen schädigende Umwelteinflüsse, zum Beispiel gegen einen Kälteschock, resistenter. Außerdem stellt die im Eidotter enthaltene Glukose eine Nährstoffreserve dar (SCHAETZ, 1963). Der maximale Schutzeffekt gegen den Kälteschock und eine Verlängerung der Lebensfähigkeit der Spermien wird bei einem Eidotterzusatz von 12,5 % zum Verdünner erreicht (EIBL, 1959). WILLET und SALISBURY (1942) ermittelten für den Eidotterphosphatverdünner eine optimale Konservierungstemperatur von + 4° bis 5°C. Um die Verdünnerzubereitung zu vereinfachen, wurde das industriell hergestellte "DILOPTEN" (MERCK, Darmstadt), eine sterile Pufferlösung aus tierischem Serum und Zucker, und das "SPERMASOL" (MACK, Illertissen) entwickelt. "SPERMASOL", bestehend aus einem Natriumzitrat-Kaliumphosphatpuffer, dem 10 bis 30 % Eidotter zugesetzt werden, brachte bei der Bullenspermakonservierung bessere Ergebnisse als dies mit Eidotter-Zitratverdünner erreicht werden konnte (AEHNELT, 1951). Mit gutem Erfolg wurde Bullensamen mit SPERMASOL bis 1:4 und bei sehr guten Ejakulaten bis 1:6 verdünnt. Die Befruchtungsfähigkeit war am 3. Tage noch ausreichend (HOELZER, 1951).

e) Milchverdünner

Durch ihre chemischen und physiologischen Qualitäten in Bezug auf pH-Wert, osmotischen Druck und ihren Gehalt an Eiweißstoffen zeigte sich auch die Milch als Spermaverdünner geeignet. Durch den Gehalt an Schutzkolloiden und organischen Phosphaten ist Milch eine ideale Pufferlösung, die auch die Gefahren eines Temperaturschocks mindert. 1951 wurde von THACKER und ALMQUIST bei 2000 Besamungen eine hervorragende Trächtigkeitsquote durch Sperma erzielt, welches in abgekochter Milch konserviert worden war.

Seitdem hat der Milchverdünner ständig an Bedeutung gewonnen.

Vor Verwendung der Milch als Spermaverdünner muß sie 10 Minuten bei 77 bis 97°C erhitzt werden, auch dann, wenn von in Aqua dest. resuspendiertem Trockenmilchpulver ausgegangen wird. Durch die Erwärmung wird ein an das Milchalbumin gebundener spermientoxischer Faktor, das Lactenin, unschädlich gemacht (THACKER u. Mitarb., 1954).

II. Glycerin als Zusatz zum Spermaverdünner

a) Historischer Überblick

Im Jahre 1949 fanden POLGE und Mitarbeiter, daß durch den Zusatz von Glycerin zum Verdünner Ejakulate auch noch nach Aufbewahrung bei Temperaturen bis -79°C lebensfähig blieben. Durch die Anwendung glycerinhaltiger Verdünner stieg in ihren ersten Versuchen mit menschlichem Sperma die Anzahl der lebenden Spermien, die den Gefrier- und Auftauprozess der Spermatiefkühlung überstanden hatten, wesentlich. Geflügelsperma war bei einem Zusatz von 40 % Glycerin nach dem Auftauen nicht von ungefrorenen Kontrollproben zu unterscheiden. Diese Befunde bildeten schließlich die Grundlage der weiteren Forschungen auf dem Gebiet der Tiefgefrierung tierischen Samens. Der erste Besamungserfolg mit tiefgefrorenem Samen gelang STEWART (1951). Von 5 mit Tiefgefrierkonserven besamten Kühen wurde eine Kuh trächtig und brachte ein gesundes Kalb. Bei Verwendung eines Eidotter-Zitrat-Verdünners zur Spermakonservierung und Abkühlung auf - 30°C gab POLGE (1953) einen glycerinhaltigen Verdünneranteil (Nachverdünner) bei + 5°C zu. Die größte Überlebensrate wurde erzielt, wenn der verdünnte Samen 10 % Glycerin enthielt. Eine größere Glycerinkonzentration schützt zwar in stärkerem Maße die Spermien vor dem Einfrieren und Auftauen, wirkt aber toxisch auf Bullensamen.

Der offensichtlich schützende Einfluß des Glycerins auf das Sperma bei der Tiefgefrierung war Anlass, die Wirkung des Glycerins auch auf Spermaverdünnungen bei Kühlschranktemperaturen zu prüfen.
In einem Natrium-Citrat-Verdünner führte Glycerinzusatz zu einer Verminderung der Lebensfähigkeit der Spermien (RULFESS, 1951). Bei einer Aufbewahrungstemperatur von + 5°C wurde ein Natrium-Citrat-Verdünner mit Glycerin mit einem Natrium-Eidotter-Verdünner ohne Glycerin verglichen und in seiner Konservierungsfähigkeit für Spermien gegenübergestellt. RULFESS stellte fest, daß Glycerin den Eidotter als Verdünnerkomponente nicht ersetzen kann. POLGE und ROWSON (1952) stellten fest, daß mit Sperma in glycerinhaltigen Verdünnern eine 25 % höhere Befruchtungsrate erzielt werden konnte als bei Verwendung des gleichen Verdünners ohne Glycerinzusatz. Durch Zugabe von 10 % Glycerin zu einem Magermilchverdünner konnten sowohl die Lebensdauer der Spermien als auch das Befruchtungsergebnis günstig beeinflußt werden (FLIPSE u. ALMQUIST, 1956). Ebenso erzielte McLEAN (1956) wesentlich bessere Befruchtungsergebnisse, wenn er mit Bullenejakulaten besamte, die, im Gegensatz zu glycerinfreien Milchverdünnern, in glycerinhaltigen Voll- und Magermilchverdünnern konserviert worden waren.

Inzwischen ist mit der Weiterentwicklung des Magermilch-Glycerin-Verdünners durch ALMQUIST (1959) der positive Einfluß des Glycerins auf verdünntes Sperma bei Kühlschranktemperaturen unumstritten.

b) Wirkung des Glycerins auf die Spermien
Eine Reihe von Autoren berichtete über die Wirkungsweise des Glycerins bei der Spermientiefgefrierung und bei Aufbewahrung des verdünnten Samens bei Kühlschranktemperatur. Einen Hinweis, daß das Glycerin in die Spermien eindringt, bietet die Tatsache, daß Spermien bei Anwesenheit von Glycerin keine Formveränderungen erleiden (De GROOT, 1956). Der etwa fünfmal höhere osmotische Druck des Glycerins

gegenüber den übrigen Verdünnerbestandteilen würde andernfalls die Spermaform zerstören. Mit Hilfe von radioaktiven Kohlenstoff-C^{14} enthaltendem Glycerin wurde nachgewiesen, daß Glycerin tatsächlich in das Protoplasma des Spermas eindringt und in den Stoffwechsel einbezogen wird (O'DELL u. Mitarbeiter, 1956). Der Glycerinabbau ist an das Vorhandensein lebender Zellen gebunden und geht unter aeroben Bedingungen mit einer vermehrten Bildung von Milchsäure einher (MANN u. WHITE, 1956). Der Fruktosestoffwechsel wird durch die Anwesenheit von Glycerin bei Kühlschranktemperatur und aeroben Verhältnissen eingeschränkt (OSTROWSKI u. EL SAWAF, 1960). Unter anaeroben Bedingungen bleibt die Fruktolyse unbeeinflußt. Im Tiefgefrierprozeß verhindert das eingedrungene Glycerin weitgehend die Kristallbildung und die damit verbundene Zerstörung des Protoplasmas (EIBL, 1959). Unter Wasseraustritt erfolgt eine Diffusion des Glycerins in die Samenzelle. Um eine maximale Glycerinwirkung zu erzielen, benötigt das verdünnte Sperma eine Glycerin-Anpassungszeit. Die Glycerinäquilibrierungszeit wird von einigen Autoren sehr unterschiedlich beurteilt. Während einige Autoren 18 Stunden für erforderlich halten, um ein Optimum an überlebenden Spermien zu erreichen (SCHMIDT u. WIECHERT, 1958; GASPAR u. HEROLD, 1960), erzielten O'DELL und HURST (1956) und SHERMAN (1957) mit 30 Min. und 5 Min. langer Glycerinanpassung keine schlechtere Beweglichkeitsrate der Spermien als nach längerer Glycerinäquilibrierung. Nach neueren Auffassungen übt das Glycerin bei der Tiefgefrierung seine Schutzwirkung durch "Abpuffern" der beim Einfrieren entstehenden Salzlösung aus, während die Verhinderung der Kristallbildung erst an zweiter Stelle steht (SCHAETZ, 1963). Durch Zusatz von 7,5 % Glycerin zu einem Magermilchverdünner wurde die Anfangsbeweglichkeit der Spermien signifikant erniedrigt (ALBRIGHT u. Mitarb., 1958). Die damit verbundene Verminderung des Stoffwechsels erklärt

die guten Konservierungseigenschaften glycerinhaltiger Verdünner bei längerer Lagerung. Ein weiteres Merkmal der Glycerinwirkung auf Bullensperma besteht in der Veränderung der Bewegungsart und Bewegungsintensität der Spermien. Im Spermasol-Eidotter-Verdünner aufbewahrten Samen bewegen sich die Spermien im mikroskopischen Bild gleichmäßig gleitend vorwärts. Glycerinisierter Samen weist stärkere Ausschläge des Kopfes und Schwanzes auf. Nach vier- bis fünftägiger Aufbewahrung bei + 5°C wird die Unterscheidung in vorwärts- und ortsbewegliche Spermien schwierig (BURKE,1959). Zwischen den Spermien verschiedener Bullen scheint hinsichtlich des Absorptionsvermögens von Glycerin ein Unterschied zu bestehen (OSTROWSKI u. EL SAWAF, 1960). So erklären sich auch unterschiedliche Bewegungsaktivitäten nach der Tiefgefrierung trotz gleicher Ausgangswerte.
Bei in-vitro-Versuchen stellte BURKE (1959) einen Spermasol-Eidotter-Verdünner einem 10 % Glycerinzusatz enthaltenden Spermasol-Eidotter-Verdünner gegenüber. Hierbei untersuchte er die unterschiedliche Empfindlichkeit der Ejakulate einzelner Bullen auf den Glycerinzusatz. Die Empfindlichkeit der Spermien gegen Glycerin war bei Zweitejakulaten geringer als beim ersten Ejakulat eines Bullen. Diese Unterschiede waren aber stets kleiner als die Empfindlichkeit der Ejakulate der verschiedenen Bullen untereinander.

c) Beeinflussung des Besamungsergebnisses
In einem Besamungsversuch mit in Eidotter-Citrat-Verdünner konservierten Ejakulaten wurde mit einem Glycerinzusatz das durchschnittliche Befruchtungsergebnis einer Bullengruppe von 59,3 % auf 67,0 % angehoben. Bei einer weiteren Bullengruppe blieb das Befruchtungsergebnis mit 66,0 % bzw. 66,7 % praktisch unverändert. In der Gruppe 1 befanden sich sogenannte schlechte Befruchter, deren Ejakulate durch den Glycerin-Zusatz auf das Niveau der sogenannten guten Befruchter der Gruppe 2 angehoben wurden (HOLT, 1953).

Das Befruchtungsergebnis eines mit Magermilch und 10 % Glycerin verdünnten Spermas war bei Versuchen von O'CONNOR und SMITH (1959) bei einem und zwei Tage altem Samen etwas schlechter als mit Magermilch ohne Glycerin verdünntem Sperma. Das einen Tag nach der Verdünnung eingesetzte magermilch-glycerin-verdünnte Sperma brachte nach 90 bis 120 Tagen non-return einen Nichtumrinderer-Anteil von 68,3 %, während mit magermilch-glycerin-verdünntem Samen 71,4 % Nichtumrinderer festgestellt wurden. Bei 4 Tage altem Samen hob der Glycerinzusatz das non-return-Ergebnis von 50 % bei magermilch-verdünntem Sperma auf 60,6 % an.

Eine deutliche Steigerung des Befruchtungsergebnisses wurde von ALMQUIST (1959) durch Glycerinzusatz zum Magermilch-Verdünner erreicht. Bei Besamungsversuchen an 200 000 Kühen wurden die Trächtigkeitsergebnisse von Sperma mit Magermilch-Verdünner mit und ohne Zusatz von Glycerin gegenübergestellt. Der Glycerinzusatz erhöhte die Befruchtungsquote bei einem Tag altem Samen um 3 %, bei zwei Tage altem Samen um 5 %, bei drei Tage altem Samen um 8 % und bei vier Tage altem Samen um 11 % gegenüber dem in glycerinfreien Verdünnern konservierten Ejakulaten.

TILLACK (1961) stellte anhand von Trächtigkeitserfolgen 2730 Erstbesamungen mit Sperma in Magermilch-Glycerin-Verdünner nach ALMQUIST, 6016 Erstbesamungen mit Sperma in Spermasol N (MACK, Illertissen) gegenüber. Die Vor- und Endverdünnungen erfolgten im Gegensatz zu ALMQUIST bei Zimmertemperatur. Die 21 Tage non-return-Rate bei Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners war eindeutig besser als beim Spermasol-Verdünner. Der Besamungserfolg fiel beim Magermilch-Glycerin-Verdünner am 2.Tag der Konservierung mit 75,5 % auf 72,6 % am 5. Tag ab, während die entsprechenden Ergebnisse mit dem Spermasol-Verdünner bei 68,6 % und 60,0 % lagen. Der absolute Befruchtungserfolg mit Magermilch-Glycerin verdünntem Sperma lag mit 75,5 % um 10,6 % höher als bei Spermasol N-verdünntem Sperma (64,9 %). Die Alterung der Spermasuspension war

bei Verwendung von Milch-Glycerin rund 5 % geringer als bei Spermasol N, wobei das letztere auch nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 16 eingesetzt werden konnte, da höhere Verdünnungsgrade von den Ejakulaten nicht vertragen wurden. Bei Magermilch-Glycerin dagegen ergaben selbst Verdünnungen von 1 : 20 keine Schädigungen.

Gute Erfolge mit hochverdünntem Samen bei Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners wurden von MÄCKLE (1961) erzielt. Bei der im Winter anfallenden Besamungsspitze wurde an 8454 Erstbesamungen gezeigt, daß eine Verdünnung 1 : 20 bis 1 : 30 mit sehr gutem Befruchtungsergebnis möglich ist. Es wurden 75,9 % Nichtumrinderer erreicht, wobei aus technischen Gründen nur die Umrinderer innerhalb von 4 Wochen berücksichtigt werden konnten.

TILLACK (1961) untersuchte im Besamungsversuch die Ejakulate von 32 Bullen in einem modifizierten Magermilch-Glycerin-Verdünner nach ALMQUIST. Als Kontrollverdünner diente ebenfalls Spermasol N. 15 sogenannte schlechte Befruchter wurden mit Magermilch-Glycerin gegenüber Spermasol N um 15,4 % in ihrem Befruchtungserfolg verbessert, 24 sogenannte gute Befruchter nur um 7,6 %. Nach seinen Beobachtungen scheint jeder Bulle, oder sogar jedes Ejakulat eine optimale Glycerinkonzentration zu erfordern. Er unterstreicht die Notwendigkeit, unterschiedliche, individuelle Reaktionen des Spermas möglichst vor der jeweiligen Verdünnung zu testen.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Allgemeines zur Versuchsanordnung

Es wurde Bullensamen mit vier verschiedenen Verdünnern konserviert und nach siebentägiger Lagerung durch Kälteschocks und hypertonische Kochsalzlösungen einer Belastung ausgesetzt.

Um die Wirkungsweise von Glycerin auf verdünnten Samen bei einer Lagerungstemperatur von + 5°C prüfen zu können, wurden Bullenejakulate in einem Magermilchverdünner konserviert, der durch Zusätze von Glycerin und Eidotter modifiziert war.

Die Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien, die in den einzelnen Verdünnern erzielt wurden, sollten einer Prüfung unterzogen und untereinander verglichen werden.

a) Untersuchungsmaterial

Von Mitte Juli bis Mitte September 1962 wurden einmal wöchentlich die Ejakulate von je 12 Bullen, die sich im Hinblick auf ihre Befruchtungsfähigkeit extrem voneinander unterschieden, zur Untersuchung herangezogen.

Es handelte sich um Bullen der Zentralbesamungsstation Schönböken, die in der folgenden Arbeit der Einfachheit halber mit fortlaufenden Zahlen von 1 bis 12 numeriert worden sind.

Die Samenentnahme und die Behandlung der Ejakulate sind bei WÖHLE (1961) und TILLACK (1961) beschrieben worden.

Die Kriterien der Beurteilung des unverdünnten Samens waren:

1. Menge
2. Massenbewegung
3. Vorwärtsbewegung
4. Dichte
5. pH-Wert

b) Verdünner und Verdünnungstechnik

Als Grundverdünner diente eine 9 %ige Magermilchsuspension mit dem Magermilchtrockenpulver "MOLICO" der

Firma NESTLE AG - Verdünner 2 -.
Dieser Grundverdünner wurde durch Eidotter- und Glycerinzusätze abgewandelt, so daß folgende 4 Verdünner in den durchgeführten Versuchen zur Prüfung kamen:

1. Magermilchsuspension mit Zusatz von 8 % Glycerin
(MG)
2. Magermilchsuspension ohne jeden Zusatz (Grundverdünner)
(M)
3. Magermilchsuspension mit Zusatz von 10 % Eidotter und 8 % Glycerin
(MEIG)
4. Magermilchsuspension mit Zusatz von 10 % Eidotter
(MEI)

Für die Zubereitung der Samenverdünnungen wurden für jedes Ejakulat 4 etwa 15 ml fassende Mischgläser sowie die vorbereiteten Verdünnerkomponenten in einem Wasserbad von + 27°C auf gleichmäßige Temperatur gebracht. Von jedem gewonnenen Bullenejakulat wurden in 4 Gläser je 0,5 ml Samen mit Glaspipetten abgefüllt.

Verdünner 1 (MG)
Das Samenmischglas Nr. 1 wurde mit 5 ml Magermilchsuspension (Grundverdünner) versehen und der Inhalt -Samen und Grundverdünner- gut durchmischt. In Abständen von je 10 Minuten wurden dann in 3 Fraktionen insgesamt 5 ml einer 16 % Glycerin enthaltenden Magermilchsuspension (ALMQUIST, 1959) hinzugefügt und mit dem Glasinhalt nochmals durchmischt.

Verdünner 2 (M)
In das Samenmischglas Nr. 2 wurden 10 ml des Grundverdünners hinzugefügt und mit dem Samen vermischt.

Verdünner 3 (MEIG)
Das Samenmischglas Nr. 3 wurde mit 5 ml einer 20 % Eidotter enthaltenden Magermilchsuspension versehen. Nach guter Durchmischung des Glasinhaltes wurde

- wie bei Verdünner 1 - der 16 % Glycerin enthaltende Verdünneranteil hinzugefügt und mit dem Glasinhalt nochmals vermischt.

Verdünner 4 (MEI)
Dem Samenmischglas Nr. 4 wurden 10 ml eines 10 % Eidotter enthaltenden Grundverdünners hinzugefügt und mit dem Samen vermischt.

Das Verhältnis von Samen zu Verdünnerflüssigkeit war mit 1 : 20 in allen 4 Samenmischgläsern gleich.
Alle für die Versuche benötigten Glasgeräte waren gründlich gesäubert und sterilisiert worden. Für die Herstellung der eidotterhaltigen Verdünneranteile gelangten nur Dotter ganz frischer Hühnereier zur Verarbeitung. Das Magermilchtrockenpulver "MOLICO" wurde in Aqua dest. gelöst und nach einer Erhitzung von 10 Minuten im Wasserbad auf + 90 bis 95°C durch sterile Gaze gefiltert.

Unmittelbar nach Fertigstellung der Samenverdünnungen wurden diese in Mengen von je 0,5 ml in Portionsgläschen abgefüllt, diese mit Verschlußkappen versehen, in Schaumgummikissen gestellt und in Kühlraumtemperatur von + 5°C gebracht. Zur Feststellung der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien kam aus jeder Versuchsreihe eine Samenportion unmittelbar nach der Abfüllung zur mikroskopischen Untersuchung (1. Kontrolluntersuchung).
In den folgenden 7 Tagen gelangte von jeder Versuchsreihe täglich je eine Samenportion zur Feststellung der Aufrechterhaltung der Vorwärtsbewegung der Spermien zur Untersuchung.

c) Die mikroskopische Untersuchung und Beurteilung des konservierten Samens

Die mikroskopische Untersuchung der Samenkonserven wurde mit einem LEITZ-Phasenkontrast-Mikroskop bei 120-facher Vergrößerung durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem Heiztisch versehen und sorgte für eine gleichmäßige Temperatur von + 38°C während der spermatologischen Untersu-

chungen.
Die Samenportionsgläschen wurden vor der Untersuchung mehrmals umgeschwenkt und ihr Inhalt gut durchmischt. Mit einer sterilen Glasstab wurde für jede Untersuchung ein möglichst gleichgroßer Tropfen Samenverdünnung auf einen vorgewärmten, sterilen und fettfreien Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Dann fand die Beurteilung der Spermienbewegung statt.

Beurteilungsschema

In der bisher vorliegenden Literatur wird eine Samenkonserve meist nach dem Prozentsatz der Spermien mit zügiger Vorwärtsbewegung beurteilt. Dieser Bewertungsmaßstab würde bei einigen Versuchsreihen nach kurzer Versuchsdauer oder nach Einwirkung schädigender Einflüsse, denen die Samenverdünnungen in den weiteren Versuchen ausgesetzt wurden, zu einer Bewertung der Vorwärtsbewegung V = 0 geführt haben.
Es hatte sich gezeigt, daß die alleinige Beurteilung einer Samenkonserve durch die mikroskopische Schätzung der Spermienvorwärtsbewegung in den verschiedenen Verdünnern nicht ausreichend war. Bei einigen Samenverdünnungen entsprach die Qualität der Spermien-Vorwärtsbewegung über die gesamte Versuchszeit der bei der 1. Kontrolluntersuchung am Beginn der Untersuchungen festgestellten Bewegungsqualität. Bei anderen Samenverdünnungen zeigte sich schon nach kurzer Beobachtungszeit, zum Beispiel 24 Stunden nach Beginn der Konservierung oder nach Einwirkung eines Kälteschocks oder hypertonischer Salzlösungen eine Verminderung der Qualität der Vorwärtsbewegung. Dabei war entweder die Geschwindigkeit der Vorwärtsbewegung der Spermien stark reduziert oder die Bewegung der Spermien war nicht mehr physiologisch. Der Abfall der Intensität der Vorwärtsbewegung konservierter Spermien deutet auf eine Qualitätsminderung der Samenkonserve hin, denn Spermien mit einer verminderten Vorwärtsbeweglichkeit zeigten im allgemeinen auch eine verkürzte Lebensdauer.

Die Bedeutung der Qualität der Spermienbewegung wurde erstmals von DESELAERS (1959) betont und zur Beurteilung der Samenkonserven verwendet. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, zur Bewertung der Bewegungsaktivität des konservierten Spermas neben der Feststellung des Prozentsatzes der vorwärtsbeweglichen Samenzellen gleichzeitig die Qualität der Spermienbewegung festzuhalten. Die Bewegungsqualität wurde in 5 Gruppen unterteilt und mit Zahlen von 1 bis 5 wie folgt belegt:

1 Spermien mit kräftiger Bewegungsintensität
(normale Frequenz und Weite des Kopfausschlages)
und mit sehr guter, gradliniger Vorwärtsbewegung

2 Spermien mit kräftiger Bewegungsintensität
(etwas erhöhte Frequenz und leichte Verstärkung
des Kopfausschlages)
bei etwas verlangsamter Vorwärtsbewegung

3 Spermien mit mäßiger Bewegungsintensität
(herabgesetzte Frequenz und verstärkter Kopfausschlag)
bei verlangsamter Vorwärtsbewegung

4 Spermien mit schwacher Bewegungsintensität
(stark herabgesetzte Frequenz und vergrößerter
Kopfausschlag)
bei stark verlangsamter Vorwärtsbewegung

5 Spermien mit sehr schwacher Bewegungsintensität
(sehr stark herabgesetzte Frequenz und stark ver-
größerter Kopfausschlag)
bei sehr langsamer und unterbrochener Vorwärtsbewegung

Beispiel:

50 % der Spermien einer Samenportion sind in Vorwärts-bewegung begriffen:

V = 50

Die Geschwindigkeit der Vorwärtsbewegung ist jedoch trotz kräftiger Intensität etwas verlangsamt (etwas erhöhte Frequenz und leichte Verstärkung des Kopfausschlages). Dieser Bewegungsqualität entspricht die der Gruppe 2 und der Beweglichkeitsprozentsatz 50 wird mit der Indexzahl 2 versehen:

$$V = 50_2$$

Dividiert man die Beweglichkeitsprozentzahl durch die Indexzahl, so ergibt sich daraus der sogenannte korrigierte Wert der Spermienbewegung.

$$V = 50 : 2; \quad V_k = 25$$

Dieser korrigierte Wert drückt also neben dem Beweglichkeitsprozentsatz konservierter Spermien gleichzeitig die Bewegungsqualität des untersuchten Samens aus und ermöglicht somit eine vollständigere Beurteilung einer konservierten Samenverdünnung.
In dieser Arbeit werden deshalb die sogenannten "korrigierten Werte" den absoluten Beweglichkeitsprozentzahlen gegenübergestellt.

II. Untersuchung des Spermas nach Lagerung über 7 Tage bei Kühlschranktemperatur von + 5°C

a) Versuchsergebnisse und ihre Besprechung
In der Tabelle 1 sind die täglichen Durchschnittswerte der absoluten und korrigierten Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien von 96 untersuchten Bullenejakulaten in den 4 verwendeten Verdünnern aufgezeichnet. Die in Klammern gesetzten Zahlen stellen die Beweglichkeitsstreubreite dar. Dabei handelt es sich um Mittelwerte der Ejakulate einzelner Bullen, die in den betreffenden Verdünnern die beste und die schlechteste Spermienbeweglichkeit aufwiesen.

Die unterste Zahlenspalte ist der Differenzwert zwischen der Anfangsbeweglichkeit des verdünnten Spermas (1.Kontrolluntersuchung) und den Beweglichkeitsprozentsätzen am letzten Tag der Untersuchung.

Tabelle 1

	M G		M		M E I G		M E I	
	absolute Werte	korrig. Werte	absolute Werte	korrig. Werte	absolute Werte	korrig. Werte	absolute Werte	korrig. Werte
1.Kontroll-untersuchung	65 (54-75)	65 (54-75)	70 (61-81)	70 (61-81)	74 (66-84)	74 (66-84)	80 (73-89)	80 (73-89)
1. Tag	56 (52-65)	56 (52-65)	59 (53-71)	58 (52-71)	65 (58-76)	65 (58-76)	70 (62-78)	68 (36-77)
2. Tag	54 (47-61)	53 (42-61)	54 (47-65)	52 (44-59)	61 (54-69)	60 (46-65)	65 (61-74)	60 (47-70)
3. Tag	49 (41-58)	46 (41-56)	49 (42-61)	44 (33-56)	57 (49-65)	53 (46-58)	61 (54-69)	52 (32-64)
4. Tag	45 (39-52)	38 (32-52)	42 (33-55)	34 (24-49)	53 (47-61)	45 (31-58)	57 (48-64)	46 (29-61)
5. Tag	40 (34-48)	33 (26-48)	34 (27-45)	24 (14-43)	50 (40-59)	38 (29-48)	53 (42-62)	37 (23-60)
6. Tag	35 (29-44)	27 (16-40)	25 (20-37)	18 (8-31)	46 (35-59)	31 (20-45)	48 (25-59)	31 (17-55)
7. Tag	29 (20-38)	21 (9-31)	17 (9-28)	11 (4-24)	40 (29-51)	26 (15-40)	41 (20-57)	27 (13-53)
Differenz-werte in %	36	44	53	59	34	48	39	53

Durchschnittswerte der Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien bei 7-tägiger Konservierung

Auf den Abbildungen 1 - 4 sind die Mittelwerte der Spermienvorwärtsbewegung von 96 Ejakulaten in den 4 Verdünnern in Prozenten graphisch dargestellt. Es sind sowohl die absoluten als auch die korrigierten Beweglichkeitsprozentzahlen aufgezeichnet.

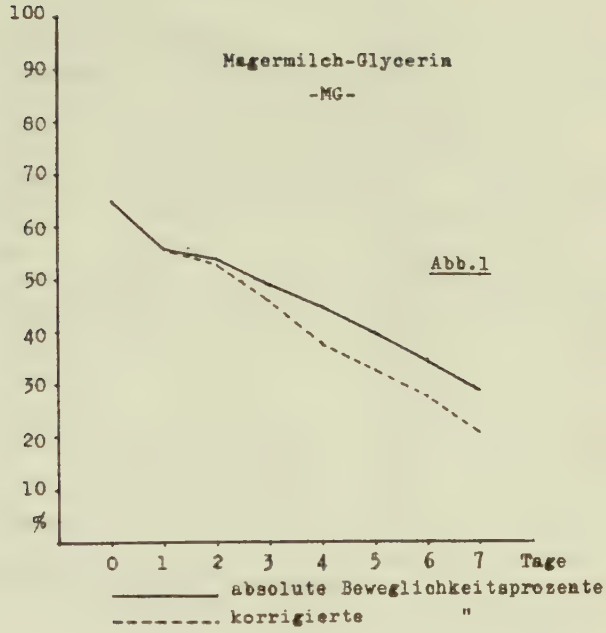

Magermilch-Glycerin
-MG-
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
%
0 1 2 3 4 5 6 7 Tage
absolute Beweglichkeitsprozente
korrigierte "

Abb.1

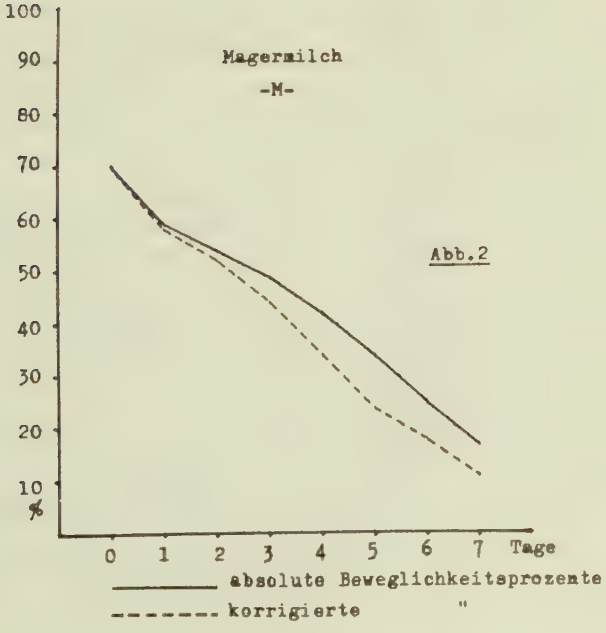

Magermilch
-M-
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
%
0 1 2 3 4 5 6 7 Tage
absolute Beweglichkeitsprozente
korrigierte "

Abb.2

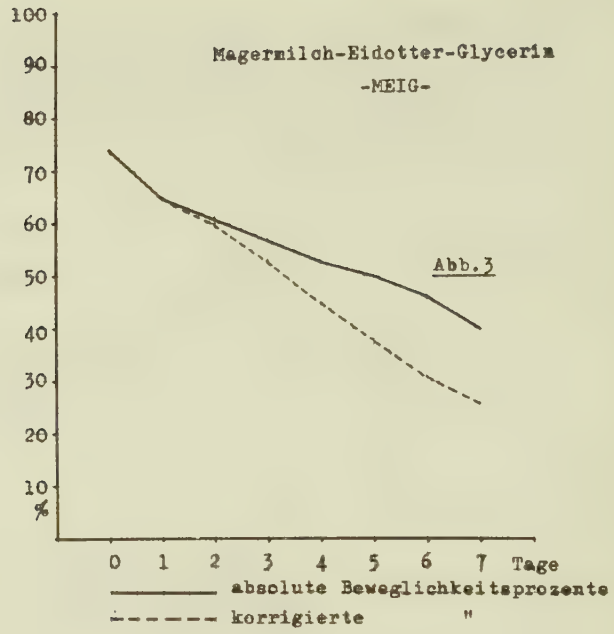

Magermilch-Eidotter-Glycerin
-MEIG-
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
%
0 1 2 3 4 5 6 7 Tage
absolute Beweglichkeitsprozente
korrigierte "

Abb.3

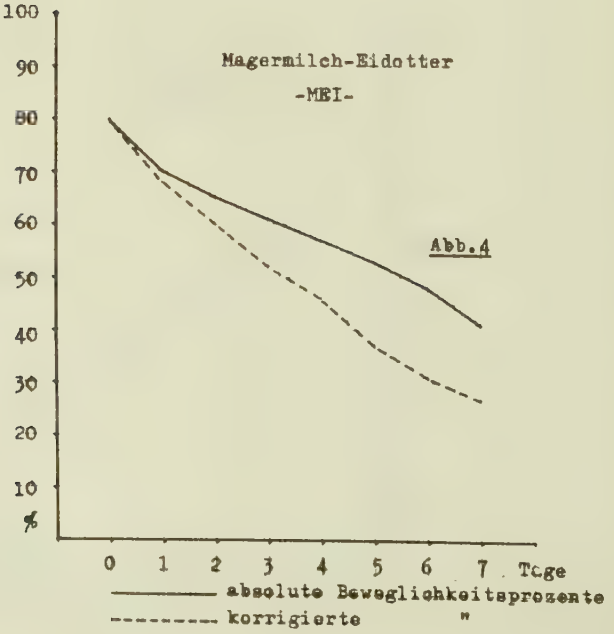

Magermilch-Eidotter
-MEI-
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
%
0 1 2 3 4 5 6 7 Tage
absolute Beweglichkeitsprozente
korrigierte "

Abb.4

Graphische Darstellung der Differenzwerte

Der unterschiedliche Einfluß der 4 Verdünner auf die Ejakulate der 12 Bullen wird durch die Abbildung 5 mit Hilfe der Darstellung der Differenzwerte deutlich gemacht.
Der Differenzwert ergibt sich aus dem Unterschied des Beweglichkeitsprozentsatzes der Spermien der 1. Kontrolluntersuchung und der Untersuchung am 7. Tag der Konservierung.
Je günstiger die Konservierungseigenschaften eines Verdünners für ein Ejakulat sind, desto kleiner ist der Abfall der Spermienbeweglichkeit zwischen Anfang und Ende der Untersuchungszeit.
Für jeden der 4 Verdünner ist der aus der Tabelle 1 errechnete Differenzwert aufgetragen. Um den Einfluß der Verdünner auf die Vorwärtsbewegung der Spermien der Ejakulate der einzelnen Bullen deutlich zu machen, sind in die gleiche Darstellung die durchschnittlichen Differenzwerte aus jeweils 8 Ejakulaten der 12 Bullen eingezeichnet. Nach beiden Seiten des Differenzmittelwertes - Durchschnitt von 96 Ejakulaten - gruppieren sich die durchschnittlichen Differenzwerte der Ejakulate der einzelnen Bullen.
Somit lassen sich die Konservierungseigenschaften der einzelnen Verdünner untereinander vergleichen. Liegt der Differenzmittelwert auf der Darstellung sehr weit links, sind die Beweglichkeitsunterschiede zwischen Anfang und Ende der Versuchszeit klein, so hat der betreffende Verdünner eine gute Konservierungseigenschaft. Eine Verschiebung des Differenzmittelwertes nach rechts, also eine Vergrößerung des Unterschiedes zwischen den Beweglichkeitsprozentsätzen von Anfang und Ende der Untersuchungszeit, läßt auf eine Verminderung der Konservierungseigenschaften schließen.
In der Abbildung 5 sind der besseren Übersichtlichkeit wegen nur die Differenzwerte aus den absoluten Beweglichkeitsprozentsätzen dargestellt.

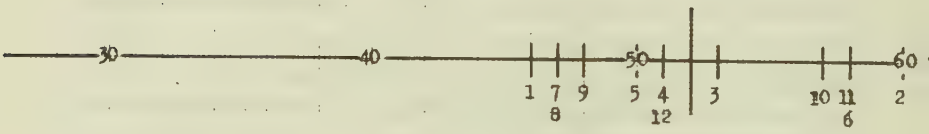
Darstellung der Differenzwerte

Magermilch-Glycerin

-MG-

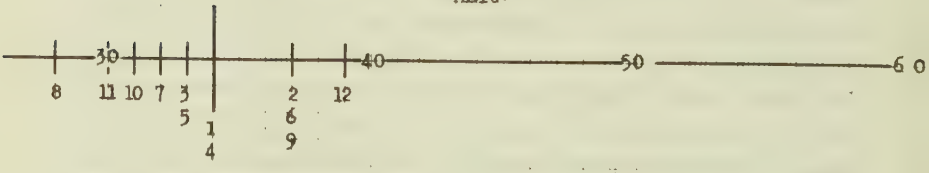
Magermilch

-M-



Magermilch-Eidotter-Glycerin

-MEIG-



Magermilch-Eidotter

-MEI-

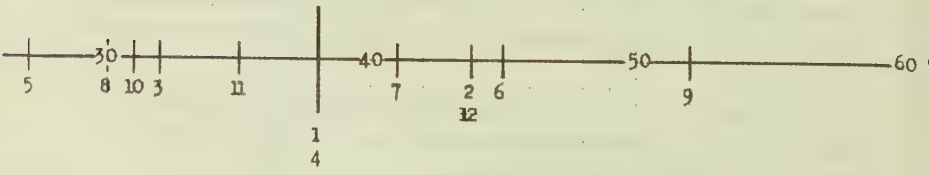


Abb.5

b) Auswertung

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß durch den Zusatz von Glycerin zu einem Magermilchverdünner der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien gegenüber dem gleichen Verdünner ohne Glycerinzusatz deutlich gesenkt wird. Während bei dem Magermilchverdünner durch Glycerinzusatz eine Verminderung der Vorwärtsbewegung von 5 %, nämlich von 70 auf 65 %, festgestellt werden konnte, war beim Magermilch-Eidotter-Verdünner sogar eine Verschlechterung der Beweglichkeitsprozentzahlen um 6 %, von 80 auf 74 % zu erkennen.

Am Tage nach der Konservierung zeigten die Spermien in allen Verdünnern einen nahezu gleichmäßigen Abfall ihrer Beweglichkeit von etwa 10 % gegenüber den Ergebnissen des Vortages.

In den folgenden Untersuchungstagen war in den glycerinfreien Verdünnern, und hier besonders in dem Verdünner ohne Eidotteranteil, eine sehr deutliche Verminderung der Prozentzahl vorwärtsbeweglicher Spermien gegenüber der im glycerinhaltigen Magermilch-Eidotter-Verdünner konservierten Ejakulate zu erkennen.

Während in den glycerinfreien Verdünnern die Qualität der Spermienbewegung sich zu verschlechtern beginnt, zeigen die Spermien in den glycerinhaltigen Verdünnern fast ausschließlich zügige und kräftige Vorwärtsbewegung. Mit zunehmender Konservierungszeit ließ sich erkennen, daß trotz einer anfänglichen Senkung der Beweglichkeitsprozentzahlen die Spermien in glycerinhaltigen Verdünnern deutlich bessere Bedingungen für eine Konservierung zu finden scheinen, als dies bei den gleichen Verdünnern ohne Glycerinzusatz der Fall ist. Dies drückt sich sowohl in den absoluten Beweglichkeitsprozentsätzen wie auch in den "korrigierten Werten" aus.

Vergleicht man den Magermilchverdünner mit Glycerin- und Eidotter-Zusatz untereinander, so kommt man zu der Feststellung, daß nach einer Differenz der Beweglichkeitsprozentzahlen von 15 % am Tage der Konservierung am 7. Tage der

Konservierung diese Differenz nur geringfügig auf 12 % zugunsten des Magermilch-Eidotter-Verdünners vermindert war.

Bei Betrachtung der "korrigierten Werte" zeigte sich, daß die Differenz der Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien zwischen diesen beiden Verdünnern am 7. Tag der Konservierung lediglich 6 % beträgt. Die "korrigierten Werte" geben offensichtlich ein deutlicheres Bild über die Qualität der Spermienbewegung.

Obwohl die prozentualen Beweglichkeitszahlen im eidotterhaltigen Verdünner erheblich über denen des glycerinhaltigen Verdünners lagen, so war im letztgenannten Verdünner eine klar bessere Qualität der Spermienbewegung erkennbar. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte festgestellt werden, daß der Eidotterzusatz zum Magermilchverdünner die Überlebensrate der Spermien bei der Konservierung erhöht, der Glycerinzusatz jedoch trotz anfänglich negativer Beeinflussung der Beweglichkeit ein Optimum im Hinblick auf die Erhaltung zügiger Vorwärtsbewegung der Spermien darstellt.

Die Vereinigung dieser beiden Eigenschaften findet man im Magermilch-Eidotter-Glycerin-Verdünner (MEIG). Die Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien am Tage der Konservierung waren in diesem Verdünner nicht so tief abgesunken, wie es im Magermilch-Glycerin-Verdünner (MG) festgestellt worden war, und der Abfall der Beweglichkeitsprozentzahlen zwischen der Kontrolluntersuchung am Tage der Konservierung und den Ergebnissen am letzten Untersuchungstag war mit 34 % der geringste von allen untersuchten Verdünnern.

Die graphische Darstellung der Differenzwerte (Abb.5) bestätigt diese Feststellungen, verdeutlicht jedoch darüber hinaus, daß die Konservierungsfähigkeit der Ejakulate einzelner Bullen sehr unterschiedlich ist, eine Tatsache, die von vielen Autoren schon mehrfach beschrieben worden ist.

Während sich die Ejakulate einiger Bullen in a l l e n Verdünnern überdurchschnittlich gut konservieren lassen (zum Beispiel Bulle 8), gibt es andere Bullen, deren Ejakulate nur in b e s t i m m t e n Verdünnern ein auffälliges Konservierungsoptimum zeigen (zum Beispiel Bulle 1 im Magermilch-Glycerin-Verdünner -MG-).

Aus der Darstellung der Differenzwerte (Abb. 5) ist jedoch schließlich auch eine Beurteilung der Verdünner untereinander möglich, nämlich anhand der Streubreiten der Konservierungsergebnisse, die sich aus Mittelwerten der Konservierung der Ejakulate der einzelnen Bullen ergeben. Während die Streuung dieser Differenzwerte im Magermilch-Eidotter-Glycerin-Verdünner (MEIG) mit 11 % ein Optimum erreicht, ist die Streuung der Differenzwerte in allen anderen Verdünnern größer und stellt im Magermilch-Eidotter-Verdünner (MEI) mit 25 % ein Maximum dar.

Aus den durchgeführten Untersuchungen kann geschlossen werden, daß der Magermilch-Eidotter-Glycerin-Verdünner (MEIG) eine gewisse Überlegenheit gegenüber den anderen 3 Verdünnern bei der Bullenspermakonservierung hat.

III. Untersuchung des Spermas nach Einwirkung eines Kälteschocks

Der Einfluß eines Glycerinzusatzes auf Bullensamen in eidotterhaltigen und eidotterfreien Magermilchverdünnern sollte durch einen Kälteschock geprüft werden. Eine Kälteeinwirkung, wie sie von LASLEY und MAYER (zitiert bei BOGART u. MAYER, 1950) beschrieben worden ist, wurde in den vorliegenden Versuchen modifiziert, um die Wirkungsweise auf die einzelnen Samenverdünnungen besser prüfen und beurteilen zu können.

a) Allgemeines zur Versuchsanordnung

Ein Plexiglasgefäß mit Deckel wurde in einen isolierenden Schaumstoffblock (Styropor) eingelassen und etwa 2 cm hoch mit Leitungswasser sowie mit Eisstücken versehen. Durch

Umrühren wurde unter Thermometerkontrolle das Wasser auf 0°C heruntergekühlt. In dieses gekühlte Wasser wurde ein Gestell mit den Samenportionsgläschen gesetzt. Durch Umrühren des Eiswassers wurde eine schnelle Temperatursenkung in den Samenampullen bewirkt.
Die Kühlzeit der Samenportionen wurde mit einer Labor-Uhr kontrolliert, am Ende der Kühlung gelangten die Samenverdünnungen sofort auf einem vorgewärmten Objektträger zur mikroskopischen Untersuchung (wie im Teil I beschrieben).

b) Vorversuche

Die Vorversuche dienten dazu, die wirksamste Kühlzeit für die Samenportionen zu ermitteln.
Um die schädigende Wirkung der Kälte auf Samenverdünnungen besser erkennen zu können, wurden neben den im Teil C dieser Arbeit beschriebenen Verdünnern zusätzlich als Kontrollproben Bullenspermien in einem Natrium-Citrat-Verdünner untersucht, der sowohl ohne als auch mit Zusätzen von 10 und 20 % Eidotter zubereitet worden war.
6 Ejakulate gelangten in folgenden Verdünnern zur Untersuchung:

1. Natrium-Citrat (NC)
2. Natrium-Citrat mit 10 % Eidotter (NCEI 10 %)
3. Natrium-Citrat mit 20 % Eidotter (NCEI 20 %)
4. Magermilchverdünner (M)
5. Magermilch-Eidotter-Verdünner (MEI)
6. Magermilch-Glycerin-Verdünner (MG)

Eine Stunde nach der Samenverdünnung wurden die in Portionsgläschen abgefüllten Spermaproben in das Eiswasser gestellt und nach 10, 20, 60 sowie 90 Minuten zur mikroskopischen Untersuchung gebracht.

Zeit	NC	NCEI 10 %	NCEI 20 %	M	MEI	MG
1 Std. n. Verd.	35	50	50	45	45	40
10 Min. 0°C	15	40	45	35	50	35
20 Min. 0°C	5	40	45	35	45	35
60 Min. 0°C	5	45	50	40	45	25
90 Min. 0°C	einige	45	50	40	45	20

Tabelle 2

Die Ejakulate, die in dem Natrium-Citrat-Verdünner ohne den die Spermien vor Kälte schützenden Eidotter zur Konservierung gelangt waren, zeigten bereits nach 10 Minuten Kühlung eine erhebliche Schädigung, ein Zeichen, daß diese Kälteeinwirkungszeit für diesen Verdünner zur Beurteilung ausreicht.

Da bei den übrigen Verdünnern bis auf den Magermilch-Glycerin-Verdünner keine sehr auffälligen Veränderungen in der Überlebensrate der Spermien festzustellen waren, - die Verschlechterung der Ergebnisse im Magermilch-Glycerin-Verdünner kann auf eine mangelhafte Glycerinanpassung zurückzuführen sein - wurden 6 Ejakulate in den gleichen Verdünnern nach einer 18-stündigen Aufbewahrung im Kühlschrank, also nach abgeschlossener Glycerinanpassung, für 10 und 60 Minuten dem Kälteschock ausgesetzt.

Die Ergebnisse gehen aus nachstehender Aufstellung hervor:

Zeit	NC	NCEI 10 %	NCEI 20 %	M	MEI	MG
18 Std. n. Verd.	5	45	45	35	55	40
10 Min. 0°C	-	45	45	35	50	40
60 Min. 0°C	-	40	45	30	50	35

Tabelle 3

Mit Ausnahme der im einfachen Natrium-Citrat-Verdünner konservierten Spermien war bei den anderen Samenverdünnungen durch diese Kältebehandlung keine wesentliche Beeinflussung der Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien zu erreichen.

Bei den folgenden Versuchen wurden 3 Ejakulate mit den Verdünnern

Magermilch (M)
Magermilch-Eidotter (MEI)
Magermilch-Glycerin (MG)
Magermilch-Eidotter-Glycerin (MEIG)

konserviert und wie folgt behandelt:

Nach der Verdünnung der Ejakulate wurden die abgefüllten

Samenportionen 18 Stunden bei Kühlschranktemperatur (+ 5°C) gelagert. Vor Einbringung der Portionen in das Eiswasser wurden sie für 6 Minuten in einem Wasserbad auf + 38°C erwärmt. Der sich anschließende Kälteschock bei 0°C dauerte 15 Minuten.
Nach der Erwärmung auf + 38°C sowie nach Beendigung des Kälteschocks fand eine mikroskopische Beurteilung der Samenverdünnungen statt.
Die Tabelle 4 zeigt die ermittelten Ergebnisse:

Zeit	MG	M	MEIG	MEI
Ejakulat 1				
18 Std. n. Verdünnung und 6 Min. + 38°C	50	60	65	70
15 Minuten 0°C	25	25	40	45
Ejakulat 2				
18 Std. n. Verdünnung und 6 Min. + 38°C	70	70	80	90
15 Minuten 0°C	15	20	55	70
Ejakulat 3				
18 Std. n. Verdünnung und 6 Min. + 38°C	45	50	75	80
15 Minuten 0°C	15	15	55	50

Tabelle 4

Die Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien in den erwärmten Samenverdünnungen stimmten mit Ergebnissen von hier nicht aufgeführten Untersuchungen, bei denen Proben aus dem Kühlschrank direkt auf den erwärmten Objektträger gebracht wurden, überein. Der Abfall der Vorwärtsbewegung der Spermien in den Samenverdünnungen dürfte also mit Sicherheit eine durch den Kälteschock bedingte Schädigung sein.

Alle bisher untersuchten Samenverdünnungen wurden zur weiteren Beobachtung nochmals in den Kühlschrank gesetzt

und nach 24 sowie 48 Stunden einer erneuten Beurteilung unterzogen. Sowohl bei den eine Stunde nach der Verdünnung geschockten Samenportionen als auch bei den 18 Stunden nach der Verdünnung mit Kälte behandelten Proben und nach 24 und 48 Stunden Kühlschrankaufbewahrung abermals untersuchten Samenverdünnungen war keine erhebliche Veränderung der Spermienbewegung festzustellen, die über das natürliche Altern der Samenzellen hinausging.

Zeit	MG	M	MEIG	MEI
1 Stunde n. Verdünnung	40	50	55	65
15 Minuten 0°C	30	35	50	55
nach 18 Stunden	20	30	45	55
nach 18 Std. + 24 Std.	20	25	40	50
nach 18 Std. + 48 Std.	20	20	30	45

Tabelle 5

Bei den späteren Betrachtungen wurde auf diese Untersuchungsmethode verzichtet.
Zur Beurteilung des Kälteschocks fanden die "korrigierten Werte" keine Berücksichtigung, da nach anfänglichen vergleichenden Betrachtungen zwischen den absoluten und "korrigierten" Beweglichkeitsprozentsätzen ein zu geringer Aussagewert bestand.

c) Hauptversuche und Besprechung der Ergebnisse

Es gelangten 96 Ejakulate - je 8 Ejakulate von 12 Bullen - in den 4 Magermilchverdünnern zur Untersuchung.
Der Kälteschock von 15 Minuten Dauer kam in der ersten Versuchsreihe 30 Minuten nach Verdünnung und in der zweiten Versuchsanordnung 18 Stunden nach der Samenverdünnung zur Anwendung.

1. Versuchsreihe

Zeit	MG	M	MEIG	MEI
Kontrolle 30 Minuten n.Verdünnung	65	70	74	80
30 Minuten n.Verdünnung und 15 Minuten 0°C	47	52	62	68
Differenz	18	18	12	12

Tabelle 6

In der ersten Zeile finden sich die Ausgangswerte, d.h. die Spermienbeweglichkeitsprozentsätze, die vor dem Kälteschock beobachtet wurden. Aus der zweiten Zeile sind die Beweglichkeitsprozentzahlen ersichtlich, die nach erfolgtem Kälteschock ermittelt wurden. In beiden Zeilen handelt es sich um Mittelwerte aus den 96 Ejakulaten.
Die dritte Zeile ergibt sich aus der Differenz der Zeilen 1 und 2, stellt also den Beweglichkeitsabfall der Spermien durch den Kälteschock dar.

2. Versuchsreihe

Zeit	MG	M	MEIG	MEI
Kontrolle 18 Stunden n.Verdünnung	56	59	65	70
18 Stunden n.Verdünnung und 15 Minuten 0°C	48	50	60	66
Differenz	8	9	5	4

Tabelle 7

Aus dieser Tabelle ist die Kälteschockwirkung 18 Stunden nach der Samenverdünnung, also nach Glycerinanpassung zu ersehen.

d) Auswertung

Die Tabellen 6 und 7 zeigen den Einfluß der Kälteeinwirkung auf die Vorwärtsbewegung von konservierten Bullenspermien in den 4 zur Untersuchung stehenden Verdünnern. In der Versuchsreihe 1 (Tabelle 6) - Kälteschock 30 Minuten nach der Samenverdünnung - ist bei den eidotterhaltigen Verdünnern ein deutlich geringerer Beweglichkeitsabfall der Spermien (12 %) gegenüber den in eidotterfreien Verdünnern konservierten Spermien festzustellen (18 %). Sowohl aus den Werten des Abfalls der Vorwärtsbewegung (Differenzwerte) als auch aus den absoluten Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien nach dem Kälteschock ist der günstige Einfluß von Eidotter als Schutzfaktor zu erkennen. Entsprechend verhalten sich die Ergebnisse der 2. Versuchsreihe (Tabelle 7). Der Kälteschock nach vorheriger 18-stündiger Kühlschranklagerung läßt auch bei diesem Versuch den günstigen Einfluß von Eidotter als Spermaverdünnerbestandteil erkennen. In den eidotterfreien Verdünnern geben die Laktoproteide den Spermien offensichtlich nicht den bei diesen Temperaturen notwendigen Kälteschutz wie es der Eidotter vermag.

Obwohl der Beweglichkeitsabfall der Spermien durch den Kälteschock in der 2. Versuchsreihe geringere Werte zeigt als im 1 Versuch, sind doch die Ausgangsbeweglichkeitsprozentsätze der Spermien nach 18-stündiger Kühlschrankaufbewahrung in allen 4 Verdünnern erheblich geringer. Die absoluten Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien liegen nach dem Kälteschock bei beiden Versuchsreihen in den jeweiligen Verdünnern in gleicher Größenordnung.

Der erwartete günstige Einfluß eines Glycerinzusatzes zum Samenverdünner im Hinblick auf einen Schutz gegen den Kälteschock trat nicht ein. Weder im Magermilchverdünner noch im Magermilch-Eidotter-Verdünner konnte durch Glycerinzusatz eine Verminderung des Beweglichkeitsabfalls der Spermien beim Kälteschock gegenüber den entsprechenden glycerinfreien Verdünnern festgestellt werden. In den glycerinhaltigen Verdünnern waren die absoluten Beweglichkeits-

prozentzahlen der Spermien sowohl vor als auch nach dem Kälteschock sogar tiefer als in glycerinfreien Verdünnern.

Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen kann gefolgert werden, daß sich ein Zusatz von Eidotter zu einem Bullenspermaverdünner bei einem Lagerungsbereich von + 5°C bis 0°C positiv im Hinblick auf eine Aufrechterhaltung der Spermienvorwärtsbewegung auswirkt. Glycerin als Zusatz zum Spermaverdünner zeigt bei einem Kälteschock sowohl 30 Minuten nach der Samenverdünnung als auch nach abgeschlossener Glycerinanpassung der Spermien 18 Stunden nach der Samenverdünnung keine Verbesserung gegenüber der Spermienbewegung, die in einem glycerinfreien Verdünner zu erzielen war.

Auf eine Beurteilung der Bewegungsqualität der Spermien mit den "korrigierten Werten" wurde bei dieser Versuchsreihe verzichtet, da sich im Vergleich zu den absoluten Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien mit dieser Bewertung keine neuen Gesichtspunkte im Hinblick auf einen unterschiedlichen Einfluß auf die Überlebensrate der Spermien durch die verschiedenen Verdünnerzusätze ergaben.

IV. Untersuchung des Spermas nach Zusatz hypertonischer Kochsalzlösungen

a) Allgemeines zur Versuchsanordnung

Im folgenden Teil der Arbeit sollte der Einfluß hypertonischer Kochsalzlösungen auf die in den 4 Verdünnern konservierten Bullenejakulate geprüft werden.

Es sollte untersucht werden, ob Bullenejakulate nach einer vollständigen Glycerinanpassung durch hypertonische Kochsalzlösungen einer geringeren Schädigung ausgesetzt sind, als dies vor einer Glycerinanpassung der Fall ist.

Vor Eintritt der Glycerineinwirkung sollte die Hüllensubstanz der Spermien durch Kochsalz einer Belastung

ausgesetzt werden. Die Quellung der Lipoproteidhülle der Spermien durch NaCl-Lösung und die dadurch eintretende Verstärkung osmotischer Vorgänge schien als schädigender Faktor für diese Untersuchungen geeignet zu sein. Es mußte eine Salzlösung gefunden werden, die einerseits so stark war, um in einer Samenverdünnung eine nachweisbare Schädigung der Spermienhülle zu bewirken, andererseits aber schwach genug war, um nach ihrer Einwirkung auf die Spermien Unterschiede der Spermienvorwärtsbewegung in den einzelnen Verdünnern erkennen zu lassen.

b) Vorversuche und ihre Ergebnisse

Die Samenportionen wurden 30 Minuten nach der Verdünnung und nach 18-stündiger Kühlschrankaufbewahrung mit Kochsalzlösungen verschiedener Dosierung und Konzentration gemischt.

Zunächst wurden die Ejakulate mit den zu prüfenden Verdünnern nur auf die halbe Endverdünnung gebracht, es wurde also eine Spermaverdünnung von 1 : 10 hergestellt. Mit Kochsalzlösungen von 0,5 ; 1,0 ; 1,5 und 2,0 % wurden die Spermasuspensionen im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Bei diesen Versuchen starben die Spermien in allen Verdünnern sehr schnell ab. Die Einwirkungszeit der Kochsalzkonzentrationen dauerte in keinem Fall länger als 5 Minuten. Unterschiedliche Resistenz der Spermien gegen die NaCl-Einwirkung kam in den einzelnen Verdünnern wegen der schnellen Schädigung der Spermien nicht zur Feststellung.

In den folgenden Versuchen wurden daher die Ejakulate wieder im Verhältnis von 1 : 20 mit den 4 Verdünnern angesetzt. Zu je 1,0 ml Samenverdünnung wurden jeweils 0,1 ml einer 5,5 %igen oder 0,1 ml einer 6%igen Kochsalzlösung hinzugesetzt und gleichmäßig mit der Spermasuspension vermischt.

Der Zusatz einer 6 %igen Kochsalzlösung zur Samenverdünnung schien die äußerste verträgliche NaCl-Menge

Für die Spermien darzustellen. Die Schädigung der Spermien war jedoch bei dieser Kochsalzkonzentration zum Teil noch so groß, daß in den weiteren Versuchen nur noch mit einem Zusatz von 0,1 ml einer 5,5 %igen NaCl-Lösung pro ml Samenverdünnung gearbeitet werden konnte.
Eine Spermaschädigung wurde mit dieser Kochsalzkonzentration erst nach vielen Stunden bemerkt. Nach 18 bis 24 Stunden Kochsalzeinwirkung auf die Spermasuspensionen waren deutliche Unterschiede bei den Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien in den verschiedenen Verdünnern zu erkennen. Der Verdünnungsgrad der Ejakulate schien in diesen Versuchen weniger nachteilig auf die Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien einzuwirken als die NaCl-Konzentration, also der Elektrolytgehalt im Verdünner.

c) Hauptversuche und Besprechung der Ergebnisse
30 Minuten nach Herstellung der Samenverdünnung (1 : 20) wurden die Portionsgläschen mit je 1,0 ml Spermasuspension gefüllt. Mit einer Mikropipette wurden jeweils 0,1 ml einer frisch zubereiteten 5,5 %igen NaCl-Lösung zugesetzt und mit dem Ampulleninhalt gut durchmischt. Wie bei den Kälteschockversuchen kamen auch hier 2 Versuchsreihen zum Ansatz. In der Versuchsreihe 1 erfolgte die Kochsalzeinwirkung 30 Minuten nach der Samenverdünnung. In der Versuchsreihe 2 erfolgte der Zusatz der NaCl-Lösung erst nach 18 Stunden, also nach abgeschlossener Anpassung der Spermien an das im Verdünner befindliche Glycerin.
Zur Untersuchung gelangten jeweils 7 Ejakulate von 12 Bullen, also 84 Ejakulate insgesamt. In der Tabelle 8 (Versuchsreihe 1) sind die durchschnittlichen Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien aller 84 Ejakulate in den 4 untersuchten Verdünnern 30 Minuten nach der Samenverdünnung sowie am Ende einer 18-stündigen Kochsalzbelastung dargestellt. Spalte 3 stellt die Beweglichkeitsdifferenz der Spermien zwischen Beginn und Ende der

NaCl-Belastung dar.

Versuchsreihe 1

Zeit	MG	M	MEIG	MEI
30 Minuten nach Samenverdünnung	56	59	65	70
Nach 18 Stunden NaCl-Belastung	37	38	48	49
Differenz	19	21	17	21

Tabelle 8

Die Tabelle 9 gibt die Ergebnisse der Versuchsreihe 2 an. Die Kochsalzeinwirkung erfolgte bei diesen Versuchen 18 Stunden nach der Samenverdünnung, also nach abgeschlossener Glycerinanpassung. Die Einwirkungszeit der NaCl-Lösung betrug hierbei im Gegensatz zu Versuchsreihe 1 24 Stunden.

Versuchsreihe 2

Zeit	MG	M	MEIG	MEI
18 Stunden nach Samenverdünnung	54	54	61	65
Nach 24 Stunden NaCl-Einwirkung	38	29	44	40
Differenz	16	25	17	25

Tabelle 9

Die Abbildung 6 gibt eine graphische Darstellung des Beweglichkeitsabfalls der Spermien in den einzelnen Verdünnern sowohl bei einer NaCl-Einwirkung 30 Minuten als auch 18 Stunden nach der Samenverdünnung.
Wie im Teil I dieser Arbeit sind um den Mittelwert -durchschnittlicher Beweglichkeitsabfall der Spermien in 84 Ejakulaten- die durchschnittlichen Differenzwerte aus den Ejakulaten jedes Bullen gruppiert.

Darstellung der Differenzwerte

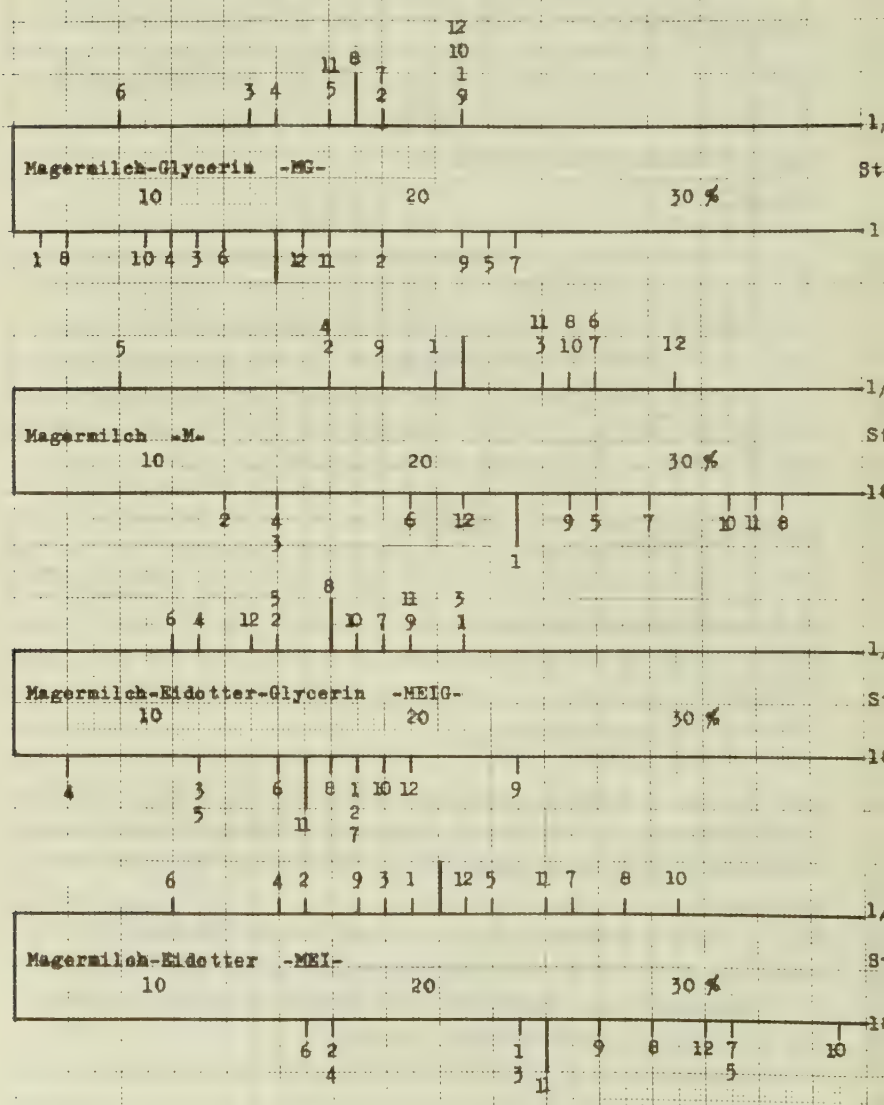


Abb.6

d) Auswertung

Bei den mikroskopischen Untersuchungen der mit Kochsalzlösungen behandelten Samenproben war in allen 4 Verdünnern die Vorwärtsbewegung der Spermien am Schluß der NaCl-Belastung stark herabgesetzt, und eine erhebliche Verschlechterung der Bewegungsqualität der Spermien war offensichtlich.

Die Samenportionen, denen 30 Minuten nach der Samenverdünnung für 18 Stunden eine NaCl-Lösung zugesetzt worden war, zeigten in allen 4 Verdünnern einen nahezu gleichgroßen Abfall der Spermienvorwärtsbewegung (Versuchsreihe 1). Bei diesen Versuchen war ein Spermaschutz durch Glycerin nicht zu erkennen.

Anders lagen die Resultate bei der Versuchsreihe 2.

Nach abgeschlossener Glycerinanpassung -18 Stunden nach der Samenverdünnung- konnte bei den glycerinhaltigen Verdünnern nach 24-stündiger Kochsalzeinwirkung ein deutlich geringerer Abfall der Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien festgestellt werden -16 % im Magermilch-Glycerin und 17 % im Magermilch-Eidotter-Glycerin-Verdünner- als bei den in glycerinfreien Verdünnern konservierten Ejakulaten -Magermilchverdünner und Magermilch-Eidotter-Verdünner je 25 %-.

Auffällig ist bei diesen Ergebnissen weiterhin die Tatsache, daß beim Vergleich der eidotterfreien mit den eidotterhaltigen Verdünnern eine nahezu gleichgroße Senkung der Spermienvorwärtsbewegung zu erkennen ist. Der Zusatz von Eidotter zu einem Magermilchverdünner scheint demnach kein Schutz gegen die Elektrolytbelastung einer Kochsalzlösung zu sein. Wie bei den Versuchen über die Einwirkung eines Kälteschocks wurde auch bei dieser Versuchsreihe auf eine Beurteilung der Bewegungsqualität mit den sogenannten "korrigierten Werten" wegen eines zu geringen Aussagewertes verzichtet.

D. DISKUSSION

Über die vergleichende Wirkung von Glycerin auf Bullensperma unter verschiedenen Bedingungen -Lagerung, Kälteschock, hypertonische Kochsalzlösungen- in eidotterfreien und eidotterhaltigen Magermilchverdünnern lassen sich in der vorliegenden Literatur nur wenige Hinweise finden.
Es galt in den durchgeführten Untersuchungen zu klären, welchen Einfluß der Glycerinzusatz auf die Konservierungsfähigkeit des Spermas bei Kühlschranktemperaturen ausübt, welchen Einfluß Glycerin auf die Spermabewegung bei Einwirkung eines Kälteschocks hat und ob Glycerin die schädigende Wirkung hypertonischer Kochsalzlösungen auf die Spermien beeinflußt.
Durch den Glycerinzusatz tritt sowohl im eidotterfreien als auch im eidotterhaltigen Magermilchverdünner eine Senkung der Anfangsbeweglichkeit der Spermien um 5 % ein. ALBRIGHT und Mitarbeiter (1958) führten auf diese Tatsache die guten Konservierungseigenschaften glycerinhaltiger Verdünner zurück.
Die Feststellung wurde durch die eigenen Versuchsergebnisse bestätigt. Bei Durchschnittswerten von 96 Bullenejakulaten wurde beobachtet, daß der Beweglichkeitsabfall der Spermien in einem eidotterfreien Magermilchverdünner nach Glycerinzusatz 5 % beträgt. Vergleichsweise ist der Beweglichkeitsabfall in einem glycerinhaltigen Magermilch-Eidotter-Verdünner sogar um 6 % größer als bei einem glycerinfreien Magermilch-Eidotter-Verdünner.
Im Gegensatz zu BURKE (1959), der feststellte, daß sich bei der mikroskopischen Untersuchung des in glycerinhaltigem Verdünner konservierten Samens die Spermien gegenüber der in glycerinfreiem Spermasol-Eidotter-Verdünner konservierten Ejakulate durch stärkere Ausschläge des Kopfes und des Schwanzes auszeichneten, wurde in dieser Arbeit beobachtet, daß Spermien in glycerinhaltigen Verdünnern -besonders im Magermilch-Glycerin-Verdünner- eine gleichmäßig gleitende

Vorwärtsbewegung besser beibehalten als in glycerinfreien Verdünnern.

Um den Aussagewert der Untersuchungsergebnisse zu verbessern wurde die Spermabewegung bei der mikroskopischen Beurteilung in Anlehnung an DESELAERS (1951) in 5 Bewegungsqualitäten eingeteilt. Mit den sogenannten "korrigierten Werten" erwiesen sich die Prozentzahlen der vorwärtsbeweglichen Spermien besonders in den Magermilch-Eidotter-Verdünnern mit und ohne Glycerinzusatz nach 7-tägiger Lagerung bei + 5°C um 14 % niedriger als bei der Bewertung mit absoluten Beweglichkeitsprozentzahlen.

Die verschiedenen Zusätze zu dem Magermilch-Grundverdünner nach ALMQUIST (1959) lassen sich somit in ihrem Einfluß auf die Bewegungsqualität der Spermien besser bewerten. Bei der mikroskopischen Beurteilung der Bewegungsaktivitäten der Spermien nach Einwirkung eines Kälteschocks sowie hypertonischer Kochsalzlösungen ergaben sich durch die "korrigierten Werte" keine Ergebnisse, die sich nicht durch die absoluten Beweglichkeitsprozentsätze ausdrücken ließen. Dieser Bewertungsmaßstab hat nach Belastung einer Samenverdünnung durch einen Kälteschock oder eine hypertonische Kochsalzlösung bei den hier vorliegenden Versuchen keinen bemerkenswerten Aussagewert gezeigt.

Das Ausmaß der Glycerineinwirkung auf die Ejakulate der einzelnen Bullen scheint sehr unterschiedlich zu sein. Damit würden sich die Beobachtungen von OSTROWSKI und EL SAWAF (1960) bestätigen.

Das Ergebnis der Untersuchung dieser Arbeit überrascht insofern, als es sich mit den Besamungsergebnissen von ALMQUIST (1959) und TILLACK (1961) nicht in Einklang bringen läßt. Nach den vorliegenden Beweglichkeitsprozentzahlen müßten Ejakulate in Magermilch-Eidotter-Verdünner konserviert bessere Besamungserfolge verzeichnen als in Magermilch-Eidotter-Glycerin und in Magermilch-Glycerin-Verdünner suspendierte Spermien, wenn die Spermabewegung in einer Samenverdünnung einen Aussagewert über die Befruchtungsfähigkeit haben sollte.

Die Untersuchungsergebnisse über die Spermienbeweglichkeit durch den Einfluß eines Glycerinzusatzes zu einem eidotterhaltigen und eidotterfreien Magermilchverdünner unter den Bedingungen eines Kälteschocks vor und nach der Glycerinäquilibrierung ließen keine schützende Wirkung des Glycerins auf die Spermienbewegung erkennen.
Ein Glycerinzusatz zum Verdünner zeigt sowohl 30 Minuten als auch nach abgeschlossener Glycerinäquilibrierung - 18 Stunden nach der Samenverdünnung - keine Verbesserung des Beweglichkeitsprozentsatzes der Spermien gegenüber der in glycerinfreien Verdünnern konservierten Ejakulate.
Die Ansicht von ALMQUIST (1959), daß Glycerin als Zusatz zum Samenverdünner erst nach Abkühlung des Samens erfolgen soll, läßt sich dem Ergebnis dieser Arbeit folgend nicht bestätigen.
BLACKSHAW und Mitarbeiter stellten 1955 fest, daß eine Verringerung der Kälteschockwirkung auf im Eidotter-Citrat-Verdünner konservierte Spermien ausschließlich auf das im Eidotter enthaltene Lecithin zurückzuführen sei. Diese Feststellung deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. In eidotterhaltigen Verdünnern konservierte Spermien überstanden die Belastung eines Kälteschocks eindeutig besser als Spermien in eidotterfreien Verdünnern.
Von Untersuchungen über die Wirkung hypertonischer Kochsalzlösungen auf konserviertes Sperma in einem größeren Rahmen wird in der vorliegenden Literatur nicht berichtet. Nach den eigenen Versuchsergebnissen ist das Glycerin in der Lage, die Spermien vor einer Elektrolyteinwirkung zu schützen. Dieser Effekt ist nicht nur nach abgeschlossener Glycerinanpassung festzustellen, sondern in geringem Umfang auch bei Samenproben, denen man 30 Minuten nach der Ejakulatsverdünnung hypertonische Kochsalzlösungen zugesetzt hat. Eine abgeschlossene Äquilibrierung der Spermien an das Glycerin scheint offensichtlich nicht notwendig zu sein.

E. ZUSAMMENFASSUNG

96 Bullenejakulate gelangten in den folgenden Verdünnern zur Konservierung:

1. Magermilchsuspension mit Zusatz von 8 % Glycerin -MG-
2. " " ohne jeden Zusatz -M-
3. " " mit Zusatz von 10 % Eidotter und 8 % Glycerin -MEIG-
4. " " mit Zusatz von 10 % Eidotter -MEI-

Es sollte untersucht werden:

I. Die Glycerinwirkung auf die Beweglichkeit der in den 4 Verdünnern konservierten 96 Ejakulate durch tägliche Feststellung der Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien über einen Zeitraum von 7 Tagen bei einer Lagerungstemperatur von + 5°C im Kühlschrank.

II. Die Auswirkung eines Kälteschocks auf Spermien, die in den glycerinhaltigen und glycerinfreien Magermilchverdünnern mit und ohne Eidotterzusatz konserviert worden waren.

III. Die Schutzwirkung des Glycerins auf Spermien, die 30 Minuten und 18 Stunden nach der Samenverdünnung einer Belastung durch hypertonische Kochsalzlösungen ausgesetzt worden waren.

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde festgestellt:

1. Unmittelbar nach der Samenverdünnung bewirkt der Glycerinzusatz eine Senkung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien. Ihr Beweglichkeitsprozentsatz war im Magermilch-Glycerin-Verdünner 5 % kleiner als im einfachen Magermilchverdünner und 15 % kleiner als im Magermilch-Eidotter-Verdünner.

2. Die Qualität der Spermienbewegung war während der gesamten Untersuchungszeit in den glycerinhaltigen Verdünnern besser als in den glycerinfreien.

3. Der Zusatz von Eidotter zum Magermilchverdünner erhöht die Überlebensrate der Spermien gegenüber einem eidotterfreien Magermilch-Verdünner.
4. Zur besseren Beurteilung der Spermienbewegung in der Samenverdünnung wurde neben der Feststellung der Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien die Qualität der Spermienbewegung bewertet. Diese sogenannten "korrigierten Werte" hatten nur bei der einfachen Kühlschranklagerung einen Aussagewert während bei den Versuchen mit dem Kälteschock und den hypertonischen Kochsalzlösungen diese Beurteilungsmethode keine Ergebnisse brachte, die nicht mit absoluten Beweglichkeitsprozentzahlen erreicht werden konnten.
5. Glycerin als Verdünnerzusatz bietet den Spermien bei Temperaturen von $0^{\circ}C$ weder 30 Minuten nach der Samenverdünnung noch nach abgeschlossener Glycerinanpassung einen Schutz gegen den Kälteschock.
   Eidotter als Verdünnerzusatz hingegen erhöht die Überlebensrate der Spermien nach einem Kälteschock gegenüber Ejakulaten, die in einem eidotterfreien Verdünner einem Kälteschock ausgesetzt worden waren.
6. Glycerin als Verdünnerzusatz schützt die Spermien sowohl im eidotterfreien als auch im eidotterhaltigen Verdünner gegenüber der Einwirkung hypertonischer Kochsalzlösungen. Die Schutzwirkung nimmt mit fortschreitender Glycerinanpassung der Spermien zu und ist 18 Stunden nach der Samenverdünnung am größten.
7. Eidotterzusatz zu einem Magermilchverdünner bietet den Spermien gegen die Einwirkung von hypertonischen Kochsalzlösungen keinen Schutz.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. AEHNELT, E. (1951) Vergleichende experimentelle Prüfung der Spermaverdünner Eidotter-Spermasol, Eidotter-Citrat und Sp. V 161.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 58, Beil. Fortpfl.u.Bes.d.Haustiere 1, 34

2. ALBRIGHT, J.L., EHLERS, M.H. u. R.E. ERB (1958) Motility of bovine spermatozoa stored at 5°C when extended in mixtures of yolk-citrate, yolk-glycine, whole milk, skimmilk and glycerol.
J.Dairy Sci. 41, 524

3. ALMQUIST, J.O. (1959) Efficient, low cost results using milk-glycerol diluents.
A.I. Digest 7, 8

4. BISHOP, M.W.H. u. G.W. SALISBURY (1955) Effect of dilution with saline and phosphate solutions on oxygen uptake of bull semen.
Amer.J.Physiol. 181, 114

5. BLACKSHAW, A.W., EMMENS, C.W., MARTIN, J. u. I. HEYTING (1955) The preparation of deep frozen semen.
A.I. Digest 5, 6

6. BOGART, R. u. D.T. MAYER (1950) The effects of egg-yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability.
J.Anim. Sci. 9, 143-152

7. BURKE, W. (1959) Untersuchung über die Wirkung von Glycerin als Zusatz zum Natrium-Citrat-, Spermasol- und Glykokoll-Eidotter-Verdünner für Bullensperma im Reagenzglas.
Vet.med.Diss. Hannover

8. DE CROOT, B. (1952) — De invloed van glycerol op het conserven van stierensperma bij lage temperaturen (-79°C). Tschr. diergeneesk. 77, 892

9. DESELAERS, H. (1959) — Vergleichende Untersuchungen über die Beeinflussung der Bewegungsaktivität und Haltbarkeit von Bullensperma nach Verdünnung mit verschiedenen Handelsmilchsorten. Vet.med.Diss. Hannover

10. EIBL, K. (1959) — Lehrbuch der Rinderbesamung. Parey, Berlin und Hamburg

11. FLIPSE, R.J. u. J.O. ALMQUIST (1956) — Diluters for semen. IX. Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. J. Dairy Sci. 39, 1690

12. GASPAR, J. u. I. HEROLD (1958) — Wirkung einzelner Faktoren auf di Überlebenswerte von auf -79°C tiefgekühltem, mit Milch und Trockenmilch verdünntem Bullensperma (ung.). Ber.Landwirtsch.-wiss.Fak.Univ. Agrarwiss., Gödöllö, 49-63

13. HATZIOLOS, B. (1937) — Untersuchungen über die Konservierung von Bullensperma zum Zwecke der künstlichen Besamung. Zschr. Tierzüchtg.Züchtungsbiol. 38, 199

14. HOELZER, H. (1951) — Erfahrungen mit dem Verdünner "Spermasol". Dtsch.tierärztl.Wschr. 58, Beil. Fortpfl.u.Bes.d.Haust. 1,3

15. HOLT, A.F. (1953) — The effect of glycerolisation of bull semen on fertility. Vet.Rec. 65, 624 u. 679

16. KÖLLIKER, A. (1856) — Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit. Zschr. wiss.Zool. 7, 201 zit. bei SCHAETZ, F. (1963) Die künstliche Besamung bei den Haustieren. G. Fischer, Jena

17. LARDY, H.A. u. P.H. PHILLIPS (1939) — Preservation of spermatozoa. Amer.Soc.Anim.Prod.Proc. 32,219 zit. bei SCHAETZ, F. (1963) Die künstliche Besamung bei den Haustieren. G. Fischer, Jena

18. McLEAN, J.M. (1956) — Results on the use of bovine semen stored 6-10 days in homogenized whole milk, with the addition of 10 % glycerin. N.A.A.B. News. March - April 13 Ref.Dtsch.tierärztl.Wschr. 63 Beil. Fortpfl.u.Bes.d.Haust.7, 93

19. MÄCKLE, N. (1961) — Weitere Versuche zur Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners. Berliner Münchener tierärztl. Wschr. 74, 379

20. MANN, T. u. I.G. WHITE (1956) — Metabolism of glycerol, sorbitol and related compounds by spermatozoa. Nature 178, 142

21. MILOWANOW, V.K. u. O.A. SELIWANOWA (1932) — Verdünner für Haustiersperma. Probl.Zhivotn. 2, 75 zit. bei SCHAETZ, F. (Nr.30)

22. O'CONNOR, L.K. u. G.F. SMITH (1959)
The comparative fertility of bovine semen of four ages diluted with skim-milk and skim-milk and glycerol.
J. Agric. Sci. 53, 354
Ref.Anim.Breed.Abstr. 28 (1960)

23. O'DELL, W.T., FLIPSE, R.J. u. J.O. ALMQUIST (1956)
Metabolism of bovine semen. III. Uptake and metabolic utilization of glycerol -1-C^{14} by bovine spermatozoa.
J. Dairy Sci. 39, 214

24. O'DELL, W.T. u. V. HURST (1956)
The effect of glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk-sodium citrate and skimmilk semen extenders.
J. Dairy Sci. 39, 1156

25. OSTROWSKI, J.E.B. u. E.S.A. EL SAWAF (1960)
Fruktosegehalt und aerobe Fruktolyse im Bullensperma unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Glycerin.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 67, 208

26. POLGE, C., SMITH, A.U. u. A.S. PARKES (1949)
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.
Nature 164, 666
zit. bei DEMINATUS, F. (1956)
Die Tiefkühlung des Bullenspermas. Vet.med.Diss. Hannover

27. POLGE, C. u. L.E.A. ROWSON (1952)
Long-term storage of bull semen frozen at very low temperatures (-79°C). II. Int.Congr.Physiol. Path.Anim.Reprod.Artif.Insem. Vol. III. Artificial Insemination, 90-98, Kopenhagen

28. POLGE, C. (1953) The storage of bull semen at low temperatures (Symposium). Vet.Rec. 65, 557 zit. bei DEMINATUS, F. (1956) Die Tiefkühlung des Bullenspermas. Vet.med.Diss. Hannover

29. RULFFES, R. (1951) Versuche zur Verdünnung des Bullenspermas. Vet.med.Diss. Hannover

30. SCHAETZ, F. (1963) Die künstliche Besamung bei den Haustieren. G.Fischer, Jena

31. SCHMIDT, K. u. W. WIECHERT (1958) In-vitro-Versuche mit der Tiefgefrierung (-79°C) von Bullensperma. 1.Mitteilung. Arch.Tierzucht 1, 201

32. SHERMAN, J.K. (1957) Ice as a mechanical factor in death of spermatozoa on freeze-thawing. Proc.Soc.Exp.Biol. 95, 543

33. STEWART, D.L. (1951) Storage of bull spermatozoa at low temperatures. Vet.Rec. 63, 65

34. THACKER, D.L.u. J.O. ALMQUIST (1951) Milk and milk-products as diluters for bovine semen. J.Anim.Sci. 10, 1082

35. THACKER, D.L., FLIPSE, R.J. u. J. O. ALMQUIST (1954) Diluters for bovine semen. II. Effect of milk proteins upon spermatozoan livability. J. Dairy Sci. 37, 220

36. TILLACK, J. (1961) Vergleichende Untersuchungen über die Eignung der Spermaverdünner Spermasol-N und Magermilch-Glycerin zur Konservierung von Bullensamen bei Kühlschranktemperatur. Vet.med.Diss. FU Berlin

37. WILLETT, E.L. u. G.W. SALISBURY (1942) The effect of various diluters, cooling rate, temperature of storage, and some other factors, on the livability of spermatozoa in stored samples of bull semen. Ithaca (N.Y.) 1942
zit. bei SCHAETZ, F. (Nr. 30)

38. WÖHLE, W. (1961) Untersuchungen über die Eignung der Kochsalz-Resistenzprobe zur Qualitätsbeurteilung unverdünnter und in verschiedenen Verdünnern konservierter Ejakulate von Besamungsbullen und Beobachtungen über die bei der Durchführung der Resistenzprüfungen auftretenden Spermaagglutinationen.
Vet.med.Diss. FU Berlin

Am Schluß der Arbeit möchte ich zunächst Herrn Professor Dr. H. J. H e i d r i c h für die Auswahl des Themas und die zahlreichen Anregungen meinen aufrichtigen Dank sagen.

Herrn Dr. N. M ä c k l e, Leiter der Lehr- und Versuchsstation Schönböken, gilt mein herzlicher Dank für seine Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen und die Unterstützung bei der Durchführung.

Für die jederzeit freundliche Beratung bei der Abfassung der Arbeit danke ich Herrn Dr. D. R o h l o f f.

Mein besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgemeinschaft Schleswig-Holsteinischer Rinderbesamungsvereinigungen und dem Zentralbesamungsverein Schönböken für die materielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten.

Lebenslauf

Am 3. Mai 1936 wurde ich, Joachim S e v e r i n, als Sohn des Landwirts Fritz Severin und seiner Ehefrau Änne Severin geb. Günther in Badeborn geboren.

Von 1942 bis 1949 besuchte ich in Badeborn die Grundschule. Das 8. Schuljahr absolvierte ich in Ballenstedt. Nach dem Besuch der Oberschule legte ich hier die Reifeprüfung ab.

Zum Wintersemester 1955 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert.
Am 7. Oktober 1957 schloß ich die vorklinischen Semester mit der Tierärztlichen Vorprüfung ab.
Im Sommersemester und Wintersemester 1958/59 studierte ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Maximilian-Universität München. Zum Wintersemester 1959/60 war ich wieder an der Freien Universität Berlin und legte am 28. November 1960 das Staatsexamen ab.

Am 1. Juli 1961 wurde mir die Bestallung als Tierarzt erteilt.